

令和元年6月24日現在

機関番号：32419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01435

研究課題名(和文) 物理的刺激による骨粗鬆症の新しい治療方法の開発

研究課題名(英文) Development of new methods for osteoporosis treatment by physical stimuli

研究代表者

鈴木 敦子 (Suzuki, Atsuko)

人間総合科学大学・人間科学部・教授(移行)

研究者番号：80162923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、麻酔下・人工呼吸下のラットを用いて大腿動脈の分枝に沿って大腿骨に入る神経の活動を記録し、自発性活動がある、一時的な呼吸停止により活動が増加する、血圧上昇により活動が減少する、自律神経節遮断剤により活動が消失する、という特性を見出し、この神経が交感神経と考えられることを示した。

さらに運動によって誘発される骨量増加に対する交感神経の影響を骨粗鬆症モデルラット(卵巣除去)で調べた。予め交感神経(副腎神経叢及び腹腔神経節)を除去しておいたラットでは、6週間のトレッドミル運動後に対照ラットよりも骨塩量が多かった。このことから、交感神経は運動時の骨量増加に抑制的に働くと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、動脈に沿って大腿骨に入る神経には交感神経が含まれていること、交感神経を除去しておくこと、運動による骨塩量増加が促進されること、が明らかになり、新しい知見を得ることができた。この結果から、交感神経活動を低く保って運動をすれば骨量が増加しやすくなると考えられる。これは薬だけではなく生活習慣が骨粗鬆症や骨折の予防に役立つ可能性を示しており、意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the activity of the nerve which run along the artery to femur was recorded in anesthetized and artificially ventilated rats. The nerve showed spontaneous discharges, and the discharges were increased by short-lasting asphyxia, decreased by vasopressor, and abolished by autonomic ganglionic blocker. From these properties, the recorded nerve was considered sympathetic nerve.

Furthermore, the effects of the sympathetic nerve on bone were investigated in ovariectomized rats (model for osteoporosis). After treadmill exercise for six weeks, the bone mineral content in the rats whose coeliac ganglia and adrenal plexuses had been removed was higher than that in the control rats. This result suggests that keeping sympathetic activities lower and doing regular exercise might be useful to prevent osteoporosis and fracture.

研究分野：自律神経生理学

キーワード：骨 交感神経 骨塩量 運動 ラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は「骨強度の低下を特徴とし、骨折のリスクが増大しやすくなる骨格疾患」と定義されている(世界保健機構)。近年、わが国では急速に高齢化が進み、それに伴って骨粗鬆症患者の数も増加し、2013年の時点で国内患者数は約1,300万人(予備軍を含めると約2,000万人)と推定される。骨折を起こすと生活の質(QOL)が著しく障害され、要介護となるケースも少なくない。実際、平成22年度の厚生労働省の発表によると、要介護(支援)となる原因として骨折・転倒が10.2%もの割合を占めている。このように、QOLを維持し、介護を予防するという観点からも、骨粗鬆症や骨折を予防することは非常に重要である。

骨代謝にカルシウムやビタミンなどの栄養素や、ホルモン、サイトカインなどが関与することは良く知られている。最近、Karsentyらのグループは、レプチンが骨密度を低下させることを明らかにし(Ducy, P, et al., 2000)、この作用は交感神経を介することが示唆された(Takeda, S. et al., 2002)。さらにBabらのグループは骨支配の副交感神経が骨吸収を抑制して骨密度を上げることが示した(Bajayo, A., et al., 2012)。これらの研究から、骨支配の交感神経活動を抑制する、あるいは副交感神経活動を亢進させることで、骨量の増加が期待される。しかし、これらの研究は自律神経薬を全身性に投与し、薬理的に自律神経の作用を検討したものであり、自律神経薬は骨だけではなく、全身の自律機能にも(薬によっては中枢神経系にも)影響を及ぼす。特に高齢者では循環器疾患にかかっている人が多いが、自律神経薬は心血管系にも影響を及ぼすため、治療薬として用いる際には注意しなくてはならない。

一方、皮膚や筋、関節などへの物理的な刺激が自律神経を介して種々の内臓機能を反射的に調節する(Sato, A. et al., 1997のreviewを参照)ことが明らかにされている。

これらの事実を踏まえ、物理的刺激が骨支配の自律神経を介して骨量を増加させる可能性を検討して、薬を用いないで骨粗鬆症を予防する方法を開発したいと考えるに至った。

2. 研究の目的

骨量の調節に自律神経が関与することが薬理的な実験の結果から示されている。本研究は実験動物を用いて、(1)骨に分布する自律神経の活動を記録したり、この神経を電氣的に刺激したりすることにより、自律神経が骨量を調節することを直接証明すること、(2)骨支配の自律神経を介して骨量増加を誘発する物理的な刺激を見出すこと、を目的として開始した。実験を進めている途中で技術的な問題が生じ、当初の目的を達成することが困難となったため計画を変更し、長期的な運動による骨量増加効果に対する交感神経の関与について、薬理的手法ではなく、外科的に神経を除去する手法を用いて解明することを目的とした。大腿骨を支配する交感神経として腰部交感神経節の除去を試みたが、他の臓器を傷つけずに除去するのは難しく、手術後にラットを回復させてトレッドミル運動をできるようにするのは困難であったため、次善の方法として、腹腔神経節及び副腎神経叢の除去による影響を調べ、交感神経が骨量に及ぼす効果を解明することにした。

3. 研究の方法

実験には雌性Wistar系ラットを用いた。

(1)自律神経活動の記録

ラットをウレタン(1.2g/kg, i.p.)で麻酔して用いた。気管切開して人工呼吸にし、体温を約37.5℃に保った。頸動脈に挿入したカテーテルを介して血圧を連続的に記録した。血圧の変動、眼瞼反射などを指標として、ウレタン(初期量の約20%)を頸静脈に挿入したカテーテルから追加投与し、十分な麻酔深度になるように維持した。

骨に分布する神経は、血管に沿って走行して骨髄腔に入ることが知られている(Marieb EM & Mallatt J, 1997)。そこで腹側からアプローチして大腿部の皮膚を切開し、実体顕微鏡下で大腿動脈周囲の筋を注意深く分離した。大腿動脈から分枝して大腿骨に向かう動脈に沿って走行する神経を血管から分離し、なるべく大腿骨に近い部位で切断した。切断末梢端を双極電極にのせ、遠心性活動を記録した。

(2)骨粗鬆症モデルラットの作成と交感神経の除去

約6週齢のラットをセボフルラン3.5~4.0%で麻酔し、背側からアプローチして両側の卵巣を除去した。卵巣除去ラットを交感神経除去群と非除去群の2群に分け、除去群では卵巣除去に引き続き、両側の副腎神経叢及び腹腔神経節も除去した。

手術終了後、術創にプロカインを塗布して縫合した。アンピシリンゾル(100mg/kg)を皮下投与した後に麻酔をオフし、ラットを覚醒させた。

(3)トレッドミル運動の方法

ラットが(2)の手術から回復するまで約1週間経過を観察した後、トレッドミル運動(傾斜-7°、14~16m/min、1hr/day、6days/week)を6週間実施した。

(4)大腿骨の採取・計測

(3)のトレッドミル運動期間(6週間)が終了した時点で、ラットに過剰のペントバルビター

ル (100-150 mg/rat) を腹腔内投与して安楽死させ、両側の上腕骨と大腿骨を摘出し、100 で 24 時間乾燥させ、乾燥重量を計測した。その後、(株)クレハ分析センターに依頼して、DXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) 法にて骨塩量、骨面積、骨密度を計測した。

計測結果は平均値 ± SD で表し、対照群と交感神経除去群間の有意差検定には unpaired t-test を用いた (有意水準は $p < 0.05$)。

4. 研究成果

(1) 大腿骨支配の自律神経活動の記録

大腿動脈から分枝して大腿骨に入る血管に沿って走行する神経を記録したところ、自発性活動がみられた (図 1 A)。この自発性活動は呼吸の一時停止 (20~30 秒間) で増加し、昇圧剤 (ノルアドレナリン) 投与による血圧上昇時に低下し、自律神経節遮断薬 (ヘキサメソニウム) 投与により消失した (図 1 B-D)。これらの特性は、これまでに報告されている交感神経活動の特性と一致する。したがって、この神経は、骨支配の交感神経であると考えられた。大腿骨に分布する副交感神経は、節前ニューロンの細胞体の位置から、骨盤神経の枝と考えられるので (Bajayo, A., et al., 2012), 実体顕微鏡下で大腿骨に分布する骨盤神経の分枝を捜したが、見つけることはできず断念した。

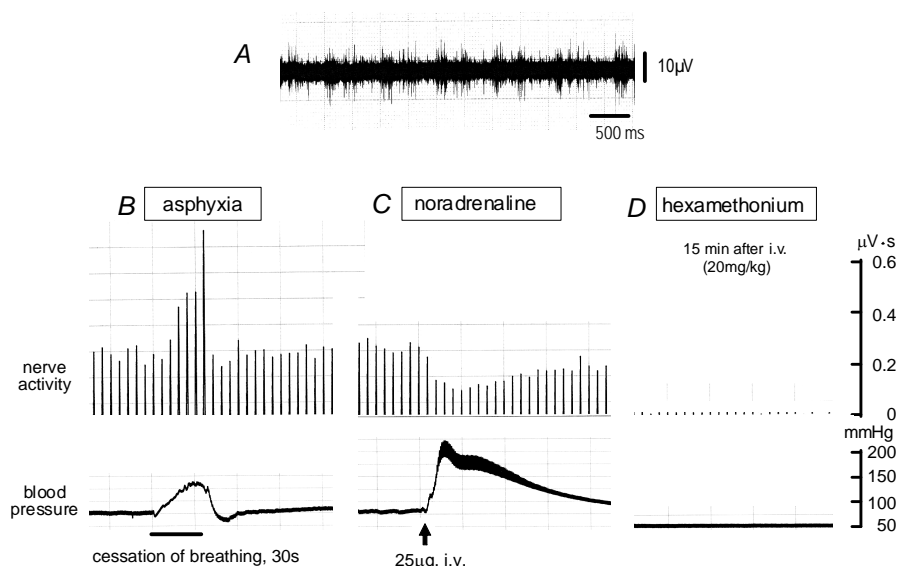


図 1 大腿骨支配の神経活動を記録した一例

A: 安静時の自発性神経活動の記録, B~D: 神経活動 (積分処理, 上段) と血圧 (下段) の同時記録。神経活動は呼吸の一時停止 (B) により増加し、ノルアドレナリン静脈内投与による昇圧 (C) により減少し、ヘキサメソニウム静脈内投与後 (D) に完全に消失した。

次に、大腿骨を支配する交感神経活動を記録し、体性感覚刺激の効果を調べようとしたが、難航した。この交感神経は、身体の深部を走行していること、さらに周囲の組織から分離できる距離が非常に短いことから、安定して記録することが難しく、この神経の機械的な非侵襲及び侵襲刺激に対する反応も、この神経の電気刺激が骨に及ぼす影響も、調べることは困難であった。このため方針を変更し、骨粗鬆症モデルラットを用いて、運動で誘発される骨量増加に対する交感神経の効果を、外科的に交感神経を除去する手法により検討することにした。

(2) 骨粗鬆症モデルラットにおける交感神経除去の影響

骨量は運動により増加することが知られている。そこで、交感神経除去が運動による骨量増加を促進するという仮説を立てた。この仮説を検証するため、卵巣を摘出した骨粗鬆症モデルラットを長期的に運動させ、両側の副腎神経叢及び腹腔神経節の除去が運動による骨量増加に及ぼす効果を調べた。

卵巣除去あるいは卵巣除去 + 副腎神経叢・腹腔神経節除去の手術後に、6 週間のトレッドミル運動を実施した。運動期間終了後に前腕骨と大腿骨を摘出し、骨乾燥重量 (mg)、骨塩量 (mg)、骨面積 (cm²)、骨密度 (mg/cm²) を計測し、神経除去群と非除去群で比較したところ、有意差は認められなかった。しかし、ラットの体重の個体差を考慮し、体重 100g 当たりの骨乾燥重量 (mg/100g bw) と骨塩量 (mg/100g bw) を算出したところ、両者とも神経除去群で有意に増加していた ($p < 0.05$) (表 1)。

今回の実験では測定していないが、神経除去群では血中カテコールアミンレベルが慢性的に低下していたと推測できる。除去群では全身性のカテコールアミンレベルが低下し、この影響により、前肢と後肢の両方で骨塩量 (mg/100g bw) が増加したと考えられる。すなわち、交感

表1 卵巣除去+長期間のトレッドミル運動で飼育する実験条件で、腹腔神経節及び副腎神経叢除去が上腕骨と大腿骨に及ぼす影響

*p<0.05; 対照群と比較して、除去群に有意な差が認められたことを示す。(各群のn=8)

	上腕骨		大腿骨	
	対照群	除去群	対照群	除去群
骨乾燥重量 (mg)	191.9 ± 13.72	200.9 ± 12.17	410.3 ± 33.19	439.3 ± 40.92
骨乾燥重量 (mg/100g bw)	91.99 ± 3.024	94.88 ± 4.794	196.6 ± 5.849	207.0 ± 8.515 *
骨塩量 (mg)	91.64 ± 6.065	95.54 ± 6.470	192.8 ± 14.53	203.7 ± 19.29
骨塩量 (mg/100g bw)	43.94 ± 0.763	45.07 ± 0.937 *	92.38 ± 2.013	95.93 ± 2.850 *
骨面積 (cm ²)	1.359 ± 0.054	1.376 ± 0.056	2.157 ± 0.058	2.210 ± 0.093
骨密度 (mg/cm ²)	67.35 ± 2.170	69.33 ± 2.635	88.15 ± 4.599	90.69 ± 4.962

神経は骨量増加を抑制することが示唆された。

(3) 得られた成果の意義、今後の展望

本研究は、大腿動脈の分枝に沿って大腿骨栄養孔に入る神経活動を記録し、この神経には交感神経の特性が認められる、骨粗鬆症モデルラット(卵巣除去)で交感神経を除去すると、長期的な運動によって誘発される骨量増加が促進される、という新しい知見を見出した。

本研究の遂行中に技術的な問題が生じたため、当初の目的を達成することはできなかった。しかし、交感神経活動を低く保ちつつ、継続的に運動をすれば、骨量が増えやすいことを示すことができた。この結果は、服薬だけではなく、生活習慣等を改善することで骨を丈夫に保てる可能性を示唆するもので、骨粗鬆症や骨折の予防に役立つと考えられる。本研究成果を早急に学術雑誌に発表し、広く公開する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。